

法规解读

EP 9.0 - 2.6.7

Mycoplasmas

- 药典解读
- 法规重点
- 资源共享

此章节描述的是用于主细胞库、工作细胞库、病毒种子批或对照细胞的支原体检查。检查可同时采用培养法和指示细胞培养法。对于病毒收获液、批量疫苗或最终批次，采用培养法。指示细胞培养法在必要时可用于筛选培养基。核酸扩增技术(NAT)在经过适当验证后，可作为其他一种或两种方法的替代方法。

培养法

◆ 培养基的选择

使用足够数量的固体和液体培养基，确保待检测产品中可能少量存在的支原体能够在选定的培养条件下生长。液体培养基必须含有酚红。所选择的培养基已表明满足以下所示的微生物的营养特性。每批新培养基的营养特性需用所列示的适当的微生物进行验证。在支原体检查时，至少选择以下一种作为阳性对照。

- 莱氏无胆甾原体（生产中使用抗生素的人用和兽用疫苗）
- 鸡毒支原体（生产中使用禽类材料或者用于禽类的疫苗）
- 猪鼻支原体（非禽类兽用疫苗）
- 口腔支原体（人和兽用疫苗）
- 肺炎支原体（人用疫苗）或其他能利用 D-葡萄糖的如发酵支原体
- 滑液支原体（生产中使用禽类材料或者用于禽类的疫苗）

测试菌株经过有限次培养（不超过15次），冷冻或冻干保存。克隆后，这菌株需要与典型培养株比较鉴定，例如：

A. laidlaw（莱氏无胆甾原体）	NCTC 10116	CIP 75.27	ATCC 23206
M. gallisepticum（鸡毒支原体）	NCTC 10115	CIP 104967	ATCC 19610
M. fermentans（发酵支原体）	NCTC 10117	CIP 105680	ATCC 19989
M. hyorhinis（猪鼻支原体）	NCTC 10130	CIP 104968	ATCC 17981
M. orale（口腔支原体）	NCTC 10112	CIP 104969	ATCC 23714
M. pneumoniae（肺炎支原体）	NCTC 10119	CIP 103766	ATCC 15531
M. synoviae（滑液支原体）	NCTC 10124	CIP 104970	ATCC 25204

莱氏无胆甾原体，发酵支原体，猪鼻支原体，口腔支原体和滑液支原体适合用作低传代参考菌株。

◆ 孵育条件

使用足够数量的固体和液体培养基，确保待检测产品中可能少量存在的支原体能够在选定的培养条件下生长。液体培养基必须含有酚红。所选择的培养基已表明满足以下所示的微生物的营养特性。每批新培养基的营养特性需用所列示的适当的微生物进行验证。在支原体检查时，至少选择以下一种作为阳性对照。

◆ 营养特性

对每批新培养基进行营养性能试验。在选定的培养基中接种测试微生物；每个含 9mL 固体培养基的 60mm 培养皿以及 100mL 液体培养基容器不超过 100CFU；每种微生物使用单独的培养皿和容器。在规定时间内，从液体培养基取 0.2mL 传代至固体培养基（见下面“待检产品中支原体的检测”小节）。每种测试微生物有合乎要求的生长（获得的生长量与接种量的比值不大于 5），则固体培养基符合测试要求。若每种测试微生物从肉汤中转至琼脂培养基继代培养至少 1 次，则液体培养基符合要求。

◆ 抑制物

对于一个既定的产品需进行一次抑制物的测试，而每当生产方法发生变化可能影响支原体检测时需重复进行。

为了证明不存在抑制物，需在有和没有待测产品的情况下进行营养特性测试。如果微生物在没有待测产品的情况下比在其存在下更快地进行超过 1 代的继代培养，或者直接接种到含有被测产品的平板的菌落数比不含被测产品的平板的菌落数少 1/5，则存在抑制物。其抑制作用必须通过中和或者其他方法来消除，例如在试验前使用不含抑制剂的试剂或者用较大体积的培养基稀释。如果用稀释的方法，可以使用较大的培养基体积或者可以将接种量分至几个 100mL 烧瓶。中和或其他方法的有效性通过中和后重复抑制物测试来检验。

◆ 待检产品中支原体的检测

每 100mL 液体培养基接种 10mL 待测产品进行检测。如果加入待测产品时发现 pH 有显著变化，通过添加 NaOH 或 HCl 溶液来调节。取 0.2mL 待测产品接至每个固体培养基。液体培养基培养 20-21 天，固体培养基培养不少于 14 天（除对应于 20~21 天传代培养 7 天）。同时将未接种的液体和固体培养基作为阴性对照。接种后 2-4 天，将每个液体培养基进行传代培养，接种 0.2mL，每个固体培养基至少 1 个平板。在第 6-8 天、第 13-15 天、第 19-21 天重复上述步骤。每 2 到 3 天观察液体培养基，如果发生颜色变化，就传代培养。如果液体培养基显示细菌或真菌污染，则测试无效。如果每个培养基和每个接种日至少有 1 个平板可以读数，则该测试是有效的。阳性对照接种不超过 100CFU，阳性对照选用的微生物至少在琼脂或肉汤培养基经过一次测试。在支原体检测定期进行的地方，可能的话建议定期轮换试验微生物。“培养基的选择”小节中列出了可用的测试微生物。

◆ 结果分析

在孵育结束时，显微镜下检查所有接种的固体培养基，观察是否有支原体菌落。如果没有典型的支原体菌落生长，则产品符合要求。如果在任何固体培养基上发现典型的支原体菌落生长，则该产品不符合要求。如果 1 个或更多阳性对照菌至少在 1 个继代培养板未生长，则该试验无效。如果 1 个或更多阴性对照有支原体生长，则试验无效。如果观察到可疑的菌落，可以使用合适的验证方法来确定它们是否由支原体引起。

以下是公开的信息：

◆ 培养法的培养基推荐

建议使用下列培养基。可以使用其他培养基，前提是它们在每批待测产品或不存在的条件下维持支原体生长的能力已经得到证明。

Hayflick 培养基（推荐用于支原体的一般检测）

液体培养基

牛心浸液肉汤（1）	90.0mL	马血清（未加热）	20.0mL
酵母抽提物（250g/L）	10.0mL	酚红（0.6g/L 溶液）	5.0mL
青霉素（20000IU/mL）	0.25mL	脱氧核糖核酸（2g/L 溶液）	1.2mL
		调整到 pH 7.8	

固体培养基

按上述配方制备，用含有 15g/L 琼脂的牛心浸液琼脂代替牛心浸液肉汤。

Frey 培养基（推荐用于滑液支原体的检测）

液体培养基

牛心浸液肉汤（1）	90.0mL	必需维生素（2）	0.025mL
葡萄糖一水合物（500g/L 溶液）	2.0mL	猪血清（56°C 灭活 30 分钟）	12.0mL
β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（10g/L 溶液）	1.0mL	盐酸半胱氨酸（10g/L 溶液）	1.0mL
酚红（0.6g/L 溶液）	5.0mL	青霉素（20000 IU/mL）	0.25mL

将β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸溶液和盐酸半胱氨酸溶液混合，10min 后加入其他成分。调整到 pH 7.8。

固体培养基

牛心浸液肉汤 (1)	90.0mL	琼脂, 纯化的 (3)	1.4g
调整到 pH 7.8, 高压灭菌, 然后添加以下成分:			
必需维生素 (2) 0.025 mL		葡萄糖一水合物 (500g/L 溶液)	2.0 mL
猪血清 (56°C灭活 30 分钟)	12.0 mL	β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (10g/L 溶液)	1.0mL
盐酸半胱氨酸 (10g/L 溶液)	1.0mL	酚红 (0.6 g/L 溶液)	5.0mL
青霉素 (20000 IU/mL)	0.25mL		

Friis 培养基 (推荐用于非禽支原体检测)

液体培养基

Hanks 平衡盐溶液 (改性) (4)	800mL	蒸馏水	67mL
脑心浸液 (5)	135mL	PPLO 肉汤 (6)	248mL
酵母抽提物 (170g/L)	60mL	枯草菌肽	250mg
甲氧苯青霉素	250mg	酚红 (5g/L 溶液)	4.5mL
马血清	165mL	猪血清	165mL
调整到 pH 7.40-7.45			

固体培养基

Hanks 平衡盐溶液 (改性) (4)	200 mL	DEAE-葡聚糖	200 mg
琼脂, 纯化的 (3)	15.65 g		
搅拌均匀后高压灭菌, 冷却至 100°C, 加入 1740mL 上述液体培养基。			

牛心浸液肉汤

牛心 (用于制备浸液)	500g
蛋白胨	10g
氯化钠	5g
蒸馏水	至1000 mL
高压灭菌	

必需维生素

生物素	100mg	泛酸钙	100mg
氯化胆碱	100mg	叶酸	100mg
肌醇	200mg	烟酰胺	100mg
吡哆醛盐酸盐	100mg	核黄素	10mg
硫胺素盐酸盐	10mg	蒸馏水	至1000mL

琼脂，纯化的

一种用于微生物学和免疫学的高度精制的琼脂，通过离子交换工艺制备，具有优异的纯度、澄清度和凝胶强度。它包含：

水	12.2%	灰分	1.5%
酸不溶性灰分	0.2%	氯	0
磷酸盐（以 P_2O_5 计算）	0.3%	总氮	0.3%
铜	8 ppm	铁	170 ppm
钙	0.28%	镁	0.32%

Hanks 平衡盐溶液（改性）

氯化钠	6.4g	氯化钾	0.32g
七水硫酸镁	0.08g	六水合氯化镁	0.08g
无水氯化钙	0.112g	二水合磷酸氢二钠	0.0596g
无水磷酸二氢钾	0.048g	蒸馏水	至800mL

琼脂，纯化的

小牛脑浸液	200g	牛心浸液	250g
蛋白胨	10g	葡萄糖一水合物	2g
氯化钠	5g	无水磷酸氢二钠	2.5g
蒸馏水	至1000mL		

琼脂，纯化的

牛心浸液	50g	蛋白胨	10g
氯化钠	5g	蒸馏水	至1000mL

指示细胞培养法

细胞培养物用能与 DNA 结合的荧光染料染色。通过细胞表面的特征性微粒或丝状荧光图案可以来检测支原体；如果污染严重，则检测周围区域。细胞质中的线粒体可被染色，但与支原体的容易区分。

如果对于病毒悬浮液的结果分析受到明显的细胞病变效应的影响，则可以使用对支原体没有抑制作用的特异性抗血清或者使用不允许病毒生长的细胞培养基来中和病毒。为证明血清无抑制作用，在抗血清存在和不存在的条件下进行阳性对照试验。

◆ 培养基验证

使用 Vero 细胞或另一种在检测支原体方面等效的细胞培养物（例如生产细胞系）。通过下面所示的方法来测试要使用的细胞的有效性，接种不超过100CFU，猪鼻支原体和口腔支原体可作为合适的参考菌株。

猪鼻支原体 ATCC 29052

口腔支原体 NCTC 10112 CIP 104969 ATCC 23714

如果检测到这两种参考菌株，细胞是合适的。在使用之前，指示细胞必须在不用抗生素的情况下传代培养。

◆ 检测方法

1. 在合适的密度下培养指示细胞（例如 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 个/mL, $4 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ 个/cm²）培养 3 天就汇合了。在细胞培养容器接种 1mL 待测产品，35-38°C 培养。
2. 经过至少 3 天的培养，当细胞长到汇合时，在合适的容器表面的盖玻片或其他适合检测的容器表面（例如腔室载玻片）传代培养 3~5 天。低密度接种，在培养 3-5 天后，有 50% 的汇合度。需避免完全汇合以免影响对支原体的染色观察。
3. 移去培养基，用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液水冲洗指示细胞，加入固定液（使用双苯甲酰亚胺染色时，固定液可用新制备的体积比 1: 3 的冰醋酸和甲醇混合物）
4. 吸走固定液，用无菌水清洗细胞。如果 1h 后进行染色，需将载玻片完全干燥。
5. 加入 DNA 染色剂，放置一段时间（使用双苯甲酰亚胺染色时放置 10min）。
6. 吸走染液，用水冲洗。
7. 装好盖玻片（使用等体积的甘油和 pH 5.5 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲溶液的混合液）。用荧光显微镜在 400 倍或者更大倍数下进行观察（如果使用双苯甲酰亚胺染色，选择 330nm/380nm 的激发滤光片和 LP 440nm 的阻隔滤光片）。
8. 显微镜下检测测试培养物的核外荧光，并与阴性和阳性对照比较。支原体在指示细胞细胞质上产生点状和细丝状荧光，也可能在细胞间隙中产生。根据之前验证建立的程序，必须在显微镜下检查多个视野。

◆ 结果分析

如果不存在典型的支原体荧光，则检测的产品合格。如果阳性对照没有显示出典型的支原体荧光或者阴性对照显示出支原体荧光，则该测试无效。

核酸扩增技术（NAT）

NAT（2.6.21）可通过使用特异性引物扩增测试样本中提取的核酸来检测支原体。核酸扩增技术指示存在特定的核酸序列，而不一定存在活支原体。有许多不同的技术可以使用。本通用章没有具体规定哪种方法，但使用的方法必须根据下述描述经过验证，并需要考虑本章末所述的指导原则。使用商业试剂盒时，某些验证信息要由制造商提供。但需要注意的是引物信息不可能提供，以及试剂盒是否有改变或持续供应。

NAT 有专门一章节来叙述。在适当的验证之后，NAT 可以代替培养法和指示细胞培养法。

直接 NAT 法可以用于检测细胞毒性物质的存在，需要快速的方法。

细胞富集培养后进行核酸扩增技术检测：将待测样本和合适的细胞底物（如指示细胞培养法所述）一起培养一段时间，然后从细胞和上清中提取核酸，用核酸扩增技术检测。

◆ 验证

验证和控制过程的各个阶段需要参考标准品。参考标准品可以是支原体或者核酸。

验证检测限时，考虑到污染发生频率和进化关系，优选以下菌株来验证：

- 莱氏无胆甾原体
- 发酵支原体
- 猪鼻支原体（在细胞富集培养情况下包括，ATCC29052 菌株）
- 口腔支原体
- 肺炎支原体或鸡毒支原体
- 滑液支原体（在生产过程中使用或接触禽类材料）
- 精氨酸支原体
- 柠檬螺原体（在生产过程中使用或接触昆虫或植物材料）

特异性验证需要使用合适的除支原体以外的细菌种类。与支原体有密切进化关系的细菌种属最适合这种验证，包括梭菌、乳酸杆菌和链球菌。

使用核酸扩增技术作为替代方法的可比性研究，对每个支原体检测菌株要求如下：

- 作为培养法的替代方法：NAT 测试系统必须检测到 10CFU/mL
 - 作为指示细胞培养法的替代方法：NAT 测试系统必须检测到 100CFU/mL
- 或者根据检测样品中支原体核酸拷贝数作为检测限（使用合适的支原体核酸参考标准品）。

◆ 质控

内部质控

内部质控对于在日常检测中确认是否有抑制是必要的。内部质控可能包括引物结合位点或者其他合适的序列。优选在分离核酸之前将其添加到测试材料中，因此可以作为整个过程的质控(提取、逆转录、扩增、检测)。

外部质控

外部阳性对照包含确定数量的靶序列拷贝或 CFU，它们可来自一种或多种在测试条件验证中合适的支原体。将 1 个阳性对照需设置在阳性临界值附近，以证明可达预期的灵敏度，外部质控不包含目标序列，但并不一定要与测试物具有相同基质。

◆ 结果分析

所用引物也可能扩增非支原体的细菌核酸，导致假阳性结果。必要时，在验证时需建立阳性结果确认程序。

以下是公开的信息

核酸扩增技术（NAT）

◆ 范围

核酸扩增技术（NAT）可用于定性或定量检测核酸。为了检测各种样本，例如疫苗和细胞基质样本中的支原体污染，定性检测是足够的，可以被认为是限度检测。

这份指南描述了验证 NAT 定性检测支原体污染的方法，也适用于实时 NAT 控制污染物的限度检测。这个分析程序的验证最重要的两个特征是特异性和检测限。

此外，分析程序的耐用性也应予以评估。为了达到本文件的目的，分析程序被定义为从核酸提取到扩增产物检测的完整过程。商业化试剂盒可用于部分或全部的分析程序，试剂盒制造商提供的验证数据文件，可以代替用户的验证。毋庸置疑，有关预期用途的试剂盒的性能，必须由用户来证明（例如检测限，耐用性，其他类别细菌的交叉干扰）。

NAT 可以用作：

- 补充测试（例如细胞毒性病毒悬浮液）或用于过程控制
- 替代一种官方方法（指示细胞培养法或培养法）

因此为了这两个目标，这份指南首先呈现的是 NAT 自身的验证，然后是 NAT 和官方方法之间可比性研究的指南。

◆ 支原体 NAT 检测验证指南

应评估三个参数：特异性，检测限和耐用性。

特异性

特异性是指存在可能预期组分的情况下明确评估目标核酸的能力。NAT 的特异性取决于引物的选择，探针的选择（用于分析最终产物）和测试条件的严格性（扩增和检测步骤）。

NAT 检测大多数支原体的能力取决于对引物，探针和方法参数的选择。应使用有代表性的参考菌株盘（例如 EDQM 提供的参考菌株）来证明检测的能力。由于 NAT 系统通常基于混合的引物，不推荐将引物和探针与数据库进行理论比对分析，因为对结果的解释可能相当复杂，可能也无法反映实验结果。

而且，由于引物可能会检测到其他细菌种属，因此应在验证研究中记录潜在的交叉检测。与支原体具有密切进化关系的细菌，如革兰氏阳性菌等，包括梭菌、乳酸杆菌和链球菌，非常适合此验证。但这不是一个穷尽的列表，哪些物种将会被检测出将取决于该 NAT 系统的基于引物/探针序列的理论能力。

基于该特异性验证的结果，确定该方法的特异性有差距（例如检测非支原体菌的核酸），则必须在验证研究中提出适当的策略来对日常中的阳性结果的诠释。例如，使用没有这种特异性差距的替代方法或官方方法进行第二次测试。

检测限

单个分析程序的检测限是指可检测样品中的靶核酸的最低量，但不必要以一个确切的值定量。

为了确定检测限，应确定核酸扩增分析程序的阳性临界值。阳性临界值（如章节 2.6.21 中所定义）是 95% 测试中可检测到的单位体积样品中目标序列的最小拷贝数。这个阳性临界值受到所测试的单个样品中支原体基因组分布及酶效率等因素的影响，并且可导致分析测试运行产生不同的 95% 临界值。

为了确定阳性临界值，应将内部工作菌株或 EDQM 标准株进行梯度稀释（CFU 或核酸拷贝数），在不同的日期进行测试，分析测试间偏差。

基于污染的发生频率和进化关系，优先选择下列菌株进行检测限验证：

- 莱氏无胆甾原体
- 发酵支原体
- 猪鼻支原体
- 口腔支原体
- 肺炎支原体或鸡毒支原体
- 滑液支原体（在生产过程中使用或接触禽类材料）
- 精氨酸支原体
- 柠檬螺原体（在生产过程中使用或接触昆虫或植物材料）

对于每个菌株，应测试至少 3 个独立的 10 倍稀释系列，每个稀释具有足够数量的重复，以便给出总共 24 个测试结果，对结果进行统计分析。

例如，实验室可以在不同日测试 3 个稀释浓度系列，每个稀释浓度 8 个重复；或在不同日测试 4 个稀释浓度系列，每个稀释浓度 6 个重复；或在不同日测试 6 个稀释浓度系列，每个稀释浓度 4 个重复。为了将稀释的数量保持在可控水平，应该预先进行测试，以获得阳性临界值的初值（阳性信号的最高稀释度）。然后可以在预定的初始界限点周围选择稀释范围。支原体浓度（CFU 或拷贝）可在 95% 的测试中被检测到，然后可以使用适当的统计学方法来计算。

这些结果也可以用来评估分析过程的可变性。

耐用性

分析程序的耐用性是衡量其不受方法参数微小但有意改变的影响，为正常使用提供可靠性指示。

在开发阶段应考虑评估耐用性。它应该显示在方法参数的有意变化时分析程序的可靠性。对于 NAT，方法参数的微小变化可能是至关重要的。在其开发过程中试剂（例如 $MgCl_2$ ，引物或脱氧核糖核苷酸）浓度的微小变化就可以证明其耐用性。

最后，可以通过协作研究来评估该方法的耐用性。

可比性研究指南

可以使用 NAT 代替官方方法（指标细胞培养方法和/或直接培养方法）。在这种情况下，应进行可比性研究。该可比性研究应主要包括替代方法和官方方法各自检测限的比较。然而，特异性（支原体菌盘，假定的假阳性结果）也应该考虑。

对于检测限，可接受的标准定义如下：

- 如果替代方法提出用于代替培养法，则 NAT 系统必须能检测到 10 CFU/mL 的 2-2 段中所描述的每种支原体；
- 如果替代方法提出用于代替指示细胞培养法，则 NAT 系统必须能检测到 100 CFU/mL 的 2-2 段中描述的每种支原体。

对于这两种情况，可以通过用核酸拷贝数和 CFU 校准的标准品来建立这些标准。应事先通过比较 NAT 和官方方法的性能，来建立 CFU 和核酸拷贝数之间的关系。

可以使用以下两种策略中的一种来进行此可比性研究：

- 使用相同的校准菌株样本，同时进行官方方法和 NAT 的实验比较评估两个方法的检测限；
- 进行 NAT 实验，与以前官方方法验证获得的数据进行性能比较。

在这种情况下，应仔细记录用于两者验证的标准品的校准以及它们的稳定性。

为了更好地评估替代的 NAT 与官方方法相比的所有优点和/或缺点，可比性研究报告应描述第 2 节中所有的验证要素（特异性，检测限、变异性以及耐用性）。

湖州申科生物技术有限公司 译